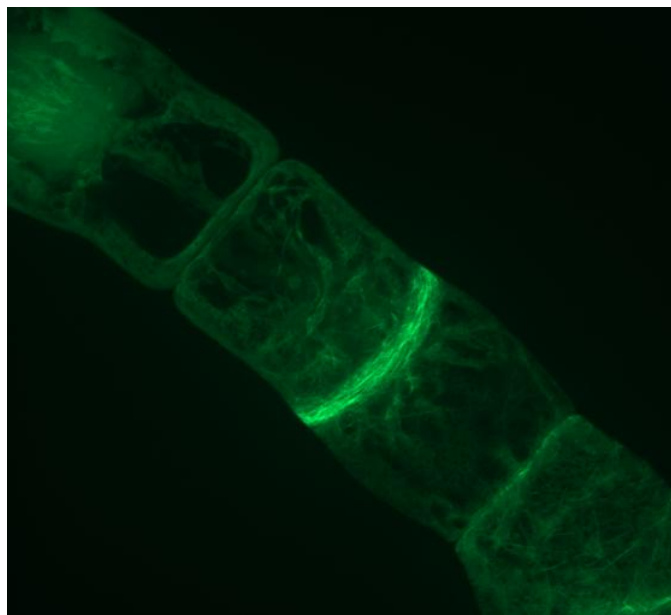


Pflanzenwachstum unter dem Einfluss des Phytohormons Auxin und dessen Hemmstoff NPA



Abschlussdokumentation
erstellt im Rahmen der Kooperationsphase des Kurses KA16

Durchgeführt am Botanischen Institut des Karlsruher Institut für Technologie
Betreut durch Prof. Dr. Peter Nick

Annika Rau
Koblenzer Str. 14
76199 Karlsruhe
rau.annika@gmx.de

Moritz Winter
Lebrechtstr. 10
76199 Karlsruhe
moritzwinter31415@t-online.de

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
1 Einleitung	2
2 Material und Methoden	3
2.1 Material	3
2.2 Methoden	4
2.3 Vorgehen	8
3 Ergebnisse	10
3.1 Phragmoplastenwinkel	10
3.2 Zellkettenlänge	10
4 Diskussion	13
4.1 Deutung	13
4.2 Fehlerdiskussion	13
4.3 Fazit	14
4.4 Ausblick	14
5 Danksagung	15
6 Quellen	16
Anhang	
Selbstständigkeitserklärung	

Abstract

The cell is the smallest unit of life. And even though every higher organism, including us humans, is made up of cells, we still don't exactly know how they coordinate and assemble themselves to work and grow together into larger structures. In plants, this is achieved through phytohormones, one of them auxin.

To get a closer look at the effect of auxin, this project examines how plant cell cultures react to the inhibitor naphthylphthalamic acid (NPA). This chemical inhibits the regular flow of auxin in chains of plant cells. Through the marking of microtubules with green fluorescent protein (GFP) they become visible under a fluorescence microscope. Using this method, changes and irregularities in the cytoskeleton can be observed. The findings were as follows: Phragmoplasts are less aligned with the cell axis than in the control culture. This points to the importance of auxin for well-structured cell and organism growth. Additionally, the chains of cells degrade a little more slowly under the influence of NPA, which points to less communication and coordination between cells.

In the future, a better understanding of cell division and growth is important when attempting to deal with problems in this system, for example in cancer therapy.

1 Einleitung

Die kleinste Einheit aller bekannten Lebewesen ist die Zelle. Einzelne Bestandteile der Zelle sind für sich noch kein Leben, zur Zelle zusammengefügt jedoch schon. Einzellige Lebewesen sind genau das – eine Zelle, die lebt und Nährstoffe verstoffwechselt und die sich teilt. Die Tochterzellen haben danach keine besondere Verbindung mehr. Andere Lebewesen bestehen allerdings aus mehr als einer Zelle. Die Zellen von Vielzellern leben im Verbund und ergeben zusammen einen größeren Organismus. Dafür ist es notwendig, dass sie miteinander kommunizieren und sich untereinander koordinieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte am Modell von Zellen der Tabakpflanze die Fragestellung untersucht: Wie wird das Wachstum von Pflanzenzellen intra- und interzellulär koordiniert und reguliert? Im Speziellen wurde der Einfluss und die Wirkweise des Phytohormons Indol-3-Essigsäure (IAA), das zur Familie der Auxine gehört, auf das Wachstum einer Zellkultur betrachtet. Sie wirkt sich auf die Ausrichtung des Wachstums einer Zelle sowie auf die Teilung der Zellen aus.

IAA ist eine schwache Säure. Daher liegt sie im leicht sauren extrazellulären Bereich als nicht geladenes Molekül vor und kann die Zellmembran durch einfache Diffusion passieren. Im schwächer sauren Inneren der Zelle jedoch gibt es ein Proton ab und liegt als Ion vor. Dadurch ist es in der Zelle gefangen.[1] Es gibt allerdings Kanalproteine, die Auxin aus der Zelle pumpen, die Pin-Transportproteine. Diese sind an einem Ende der Zelle situiert. Dadurch entsteht in einer Reihe von Zellen ein Auxinstrom, in dem Auxin von einer Zelle zur nächsten transportiert wird.

In Pflanzen wird Auxin an Knospen ausgeschüttet. Es wird von den Zellen durch die Pflanze in Richtung der Wurzeln heruntergegeben. Entlang dieses Auxinstroms entstehen dann Kanäle, durch die Mineralstoffe zu den Knospen gelangen. Hieran sieht man, wie wichtig die passende Struktur eines Gewebes für seine Funktion ist. Die Kanäle müssen an die passende Stelle führen, die passende Form haben (also etwa hohl sein) und aus passend ausgebildeten Zellen bestehen, um ihre Aufgabe zu erfüllen.

Die in Flüssigkultur verwendeten Tabakzellen haben einen Zwei-Wochen-Zyklus, während dessen sie Phasen zuerst der Teilung und dann des Wachsens durchlaufen. Die Zellen sind länglich. Wachsen sie normal, so teilen sie sich orthogonal zur Zellachse. Nach der Teilung bleiben die Tochterzellen zusammen und bilden Zellketten. Nach etwa drei bis vier Tagen teilen sich die meisten Zellen nicht weiter, sondern wachsen nur noch in Länge. Am Ende des Zyklus trennen sich die Zellen voneinander, die Ketten zerfallen. Nun müssen die Zellen in frisches Medium eingebracht werden und beginnen dann wieder, sich zu teilen.

Für sowohl Wachstum als auch Teilung einer Zelle ist das Cytoskelett von großer Bedeutung. Die Mikrotubuli der untersuchten Zellen wurden daher durch Biolistik mit GFP markiert. Das macht sie unter dem Mikroskop durch Fluoreszenz sichtbar. Dadurch werden auch die Phragmoplasten der Zellen sichtbar. Ein Phragmoplast ist eine Struktur aus Mikrotubuli, die während der Zellteilung entsteht. Sie sind an der Bildung der neuen Zellwand beteiligt. Daher sind sie für die Form der Tochterzellen von entscheidender Bedeutung. Die Betrachtung der Phragmoplasten sagt also etwas über die Geradlinigkeit der späteren Zellkette aus.

Während der Arbeit wurde die Weitergabe von IAA durch die Pin-Transportproteine mithilfe des Inhibitors NPA blockiert. Daraufhin wurden die Phragmoplasten der Zellen und der Zerfall der Zellketten beobachtet. So sollten Erkenntnisse über den Einfluss von IAA auf das Wachstum und die Ausrichtung der Zellen erlangt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Zelllinie

Es wurde die Zelllinie TuA3 verwendet. Sie stammt von der häufig genutzten Zelllinie Tabak BY-2. Die genetisch veränderten Zellen der TuA3-Linie exprimieren eine GFP-Fusion mit Tubulin A3, wodurch die Mikrotubuli unter einem Fluoreszenzmikroskop *in vivo* beobachtbar sind.

Auxin

Es gibt einige Phytohormone, die das Wachstum regeln. Sie werden als Auxine bezeichnet. Indol-3-essigsäure, $C_{10}H_9NO_2$ (indole acetic acid, IAA) wurde als erstes isoliert [2]. IAA bewirkt vor allem das Längenwachstum des Sprosses und der Wurzeln [3].

Während der gesamten Arbeit wurde eine Konzentration von 5 μ M IAA im Medium verwendet. Gelöst wurde das Auxin in Ethanol.

NPA

N-1-Naphtyl-Phtal-Essigsäure, $C_{18}H_{13}NO_3$ (N-1-naphthylphtalamic acid, NPA) ist ein Hemmstoff des interzellulären Auxintransports. Es blockiert die Efflux-Carrier oder auch Pin-Proteine genannt, die Auxin aus den Zellen transportieren.

Das NPA wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und in einer Konzentration von 3 μ M verwendet.

Kanamycin

Kanamycin ist ein Antibiotikum, das dem Medium standardmäßig beigesetzt wurde, um Bakterienwachstum zu verhindern.

Im Flüssigmedium wurde eine Konzentration von 5 μ M/l verwendet, im festen Nähragar 10 μ M/l. Kanamycin wurde in Ethanol gelöst.

Medium

Das Medium, in dem die Zellen kultiviert wurden, besteht aus folgenden Bestandteilen, die in Wasser gelöst wurden:

- 4,3 g/l Murashige und Skoog Salze (MS-Salze)
- 30 g/l Saccharose
- 200 mg/l KH_2PO_4
- 100 mg/l Inositol
- 1 mg/l Thiamin
- 0.2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (ein synthetisches Auxin)

Die Lösung hat einen pH-Wert von 5,8. Für das feste Medium wurden 8 g Agar pro Liter Lösung zugefügt. Wegen der MS-Salze wird das Medium im Folgenden als MS-Medium bezeichnet.

Spinning-Disc-Mikroskop

Das Spinning-Disc-Mikroskop wurde benutzt, um hochauflösende Bilder der fluoreszierenden Mikrotubuli zu machen.

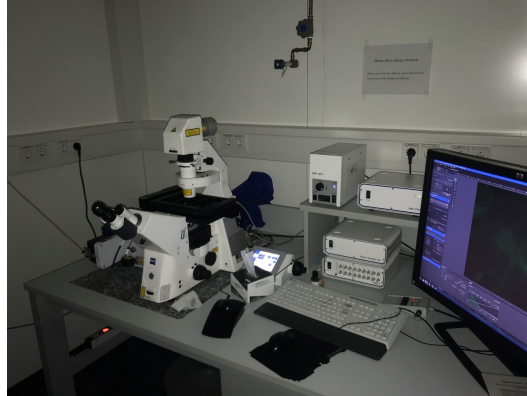


Abbildung 1: Das Spinning-Disc-Mikroskop in Betrieb; Aufnahme von grün fluoreszierenden Mikrotubuli durch Anregung von UV-Licht. Der Raum ist abgedunkelt, damit das Licht der fluoreszierenden Mikrotubuli besser aufgenommen werden kann.

Apotom-Mikroskop

Das Apotom-Mikroskop wurde hauptsächlich verwendet, um Übersichtsbilder zu machen. Es funktioniert wie ein gewöhnliches Lichtmikroskop.

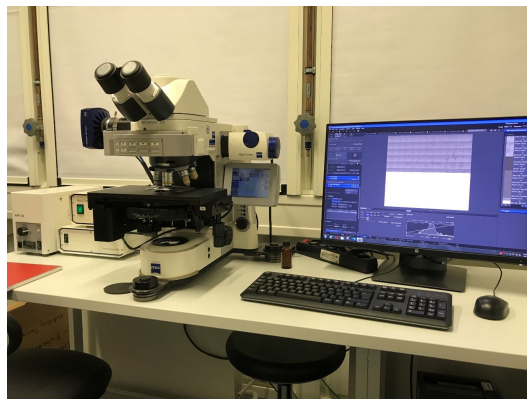


Abbildung 2: Das Apotom-Mikroskop in Betrieb. Im Moment wird ein Übersichtsbild mit der Tiles-Funktion erstellt.

2.2 Methoden

Labormethoden

Die flüssigen Zellkulturen wurden in 30 ml MS-Medium unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellkulturen wurden an einer Sterilbank an- und umgesetzt. Dabei wurde besonders auf größtmögliche

Keimfreiheit geachtet.

Vorgehen beim Umsetzen der Flüssigkultur nach Frischgewicht der Zellen:

1. Beschriften und abwiegen der Eppendorf-Gefäße, in denen später die Zellen gewogen werden
2. Entnahme von 1 ml der Mutterkulturen in die entsprechend beschrifteten Eppendorf-Gefäße, dabei wird durch Schwenken und Auf- und Ab-Pipettieren auf eine gute Durchmischung der Mutterkultur geachtet
3. Zentrifugieren der Proben bei 10 000 rpm für 10 min
4. Abpipettieren der Flüssigkeit
5. Wiegen der mit Zellen befüllten Eppendorf-Gefäße und abziehen der vorher erfassten Masse der Gefäße; nun ist die Masse der Zellen pro 1 ml bekannt, woraus berechnet werden kann, in welches Volumen der Mutterkultur 500 mg Zellen beinhaltet.
6. Vorbereiten des frischen Mediums (30 ml) mit Kanamycin, Indolessigsäure und eventuell NPA, mit den Endkonzentrationen in der fertigen Lösung von 5 μ M, 5 μ M und 3 μ M
7. Beimpfen mit der errechneten Menge der Mutterkultur

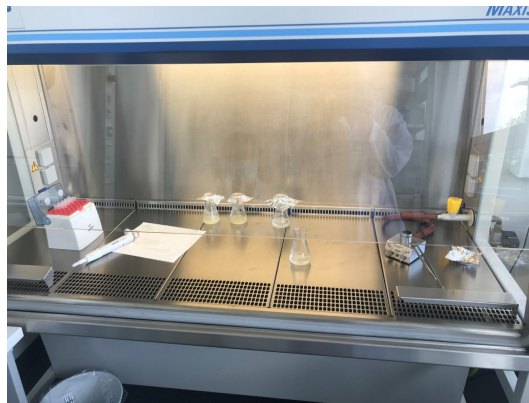


Abbildung 3: Die Sterilbank beim Entnehmen von Proben zum Mikroskopieren.

Die Zelllinie TuA3 wurde entsprechend dem Teilungszyklus alle 2 Wochen umgesetzt.

Die Zellen der festen Zellkulturen stammen von einer Flüssigkultur und die Festkulturen wurden nicht fortgeführt, also auch nicht umgesetzt. Zum Ansetzen wurden die Zellen mit Hilfe einer Pipette in einem annähernd hexagonalen Muster auf das feste Medium aufgetragen.



Abbildung 4: Sterilbank beim Ansetzen der Festkultur aus einer Flüssigkultur. Die Zellen im flüssigen Medium werden auf das feste Medium getropft.

Erfassungsmethoden

Die Zellen der Flüssigkultur wurden auf zwei Weisen mikroskopiert.

Mit dem Spinning-Disc-Mikroskop wurden Bilder der floureszierenden Mikrotubuli und Phragmoplasten in 63-facher Vergrößerung gemacht. Es wurde die Z-Stack-Funktion des Zen-Programms der Firma Zeiss [4] genutzt. Dabei schießt das Programm eine Anzahl von Bildern, die übereinander liegen, sodass man entweder eine 3D-Animation oder eine sogenannte Orthogonale Projektion erstellen kann. Bei einer Orthogonalen Projektion werden die Bilder übereinandergelegt, um mit dem 2D-Bild auch in die Tiefe schauen zu können.

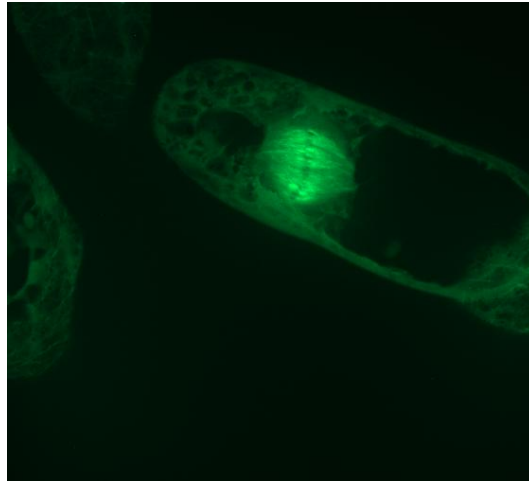


Abbildung 5: Orthogonale Projektion einer Zelle der Kontrollreihe während der Anaphase der Mitose. Das Bild wurde vier Tage nach dem Umsetzen geschossen. 63x Vergrößerung.

Mit dem Apotom-Mikroskop wurden zur Auswertung Bilder mit der Tiles-Funktion des Zen-Programms erstellt, bei der nebeneinander liegende Bilder vom Programm aufgenommen zusammengefügt wurden, um ein großes Übersichtsbild zu erhalten. Die Bilder wurden in 20-facher Vergrößerung gemacht.

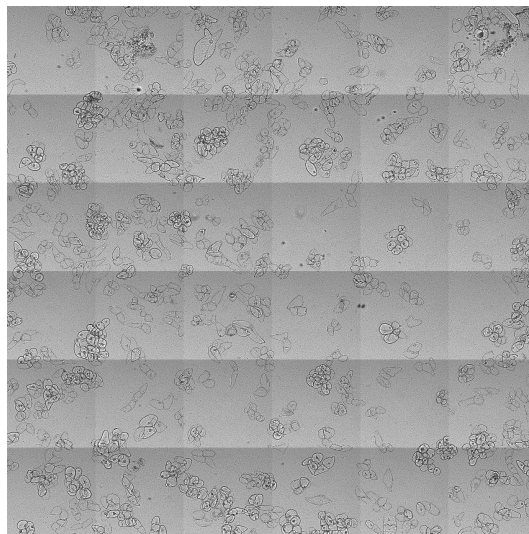


Abbildung 6: Übersichtsbild, das mit der Tiles-Funktion der NPA-Versuchsreihe 14 Tage nach dem Umsetzen. Man sieht, dass die Zellen oft einzeln, aber auch in Ketten von zwei oder mehr Zellen vorliegen. 20x Vergrößerung.

Auswertungsmethoden

Die Bilder der Phragmoplasten wurden mit Hilfe des Programms ImageJ [5] ausgewertet. Um das spätere Messen des Winkels zu erleichtern, wurden zuerst in einem Bildbearbeitungsprogramm Geraden entlang

der Zellachse und des Phragmoplasten gezeichnet. Entlang dieser Linien wurde dann der Winkel von Phragmoplast zu Zellachse gemessen. Bei einer sich ordentlich teilenden Zelle sollte dieser 90° betragen.

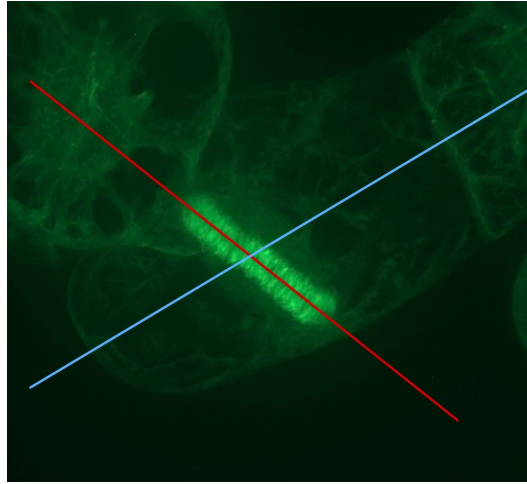


Abbildung 7: Die Orthogonale Projektion eines Phragmoplasten, vier Tage nach dem Umsetzen aufgenommen. Die Achse des Phragmoplasten ist rot, die der Zelle blau markiert. Gemessen wird die Abweichung von 90° . 63x Vergrößerung.

Um die Länge der Zellketten zu erfassen, wurden sie auf den Übersichtsbildern des Apotom-Mikroskops markiert und gezählt.

2.3 Vorgehen

Es gab zwei Ansätze, die Fragestellung zu beantworten.

Der erste Ansatz nutzte eine Flüssigkultur, um die Wirkung von NPA zu untersuchen. Dazu wurden zwei Zellreihen angesetzt, eine mit und eine ohne NPA, wobei beide zusätzlich mit IAA versetzt wurden.

Da diese Kulturen nach etwa fünf Monaten immer ungeordneter wurden, wurde eine neue Zellreihe auf dieselbe Weise angesetzt, die alte Kultur jedoch noch weitergeführt.

Bei diesen Versuchsreihen wurden einerseits der Winkel der Phragmoplasten zur Zellachse während der Zellteilung, als auch die Zellkettenlängen nach sieben Tagen untersucht.

Für den zweiten Ansatz wurde eine feste Kultur in Petrischalen verwendet. Das Ziel war, einen IAA-Gradienten herzustellen, um zu betrachten, ob sich die Zellen danach ausrichten oder anders reagieren. Dabei gab es drei Versuchsreihen, bei denen Medium mit und ohne IAA unterschiedlich verwendet wurde, wie Abbildung 8 zeigt.

Jeweils zwei Platten enthielten Medium entweder komplett mit oder ohne IAA. Das sind die Positivbeziehungsweise Negativkontrollen. Drei Platten wurden etwas spezieller vorbereitet. Die Petrischalen wurden auf einer Seite auf ihre Deckel gestellt, sodass sie etwas geneigt lagen. Nun wurde so viel durch Wärme verflüssigtes Medium gegossen, dass es auf der niedrigeren Seite die gewünschte Höhe erreichte und auf der höheren Seite knapp den Boden bedeckte. Die Platten konnten nun abkühlen und erstarren/verfestigen. Dadurch entstanden feste Keile aus mit IAA versetztem Medium. Diese wurden wieder auf eine horizontale Fläche gelegt und mit Medium ohne IAA aufgefüllt.

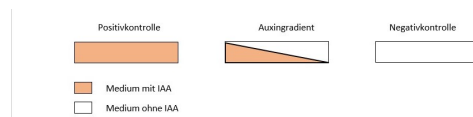


Abbildung 8: Schemazeichnung zur Veranschaulichung der Herstellung eines Auxingradienten, Positiv- und Negativkontrolle

Es wurde jedoch erst elf Tage nach Ansetzen mikroskopiert, was eindeutig zu spät war, da die Zellen in großen Haufen wuchsen, in denen fast keine individuellen Zellen erkennbar waren. Auch gab es keine sichtbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsreihen. Wenn überhaupt etwas an der Ausrichtung der Zellen erkennbar sein sollte, ist der beste Betrachtungszeitraum vermutlich etwa drei Tage nach Ansetzen, da sich zu diesem Zeitpunkt die Zellen teilen und längere Zellketten bilden.

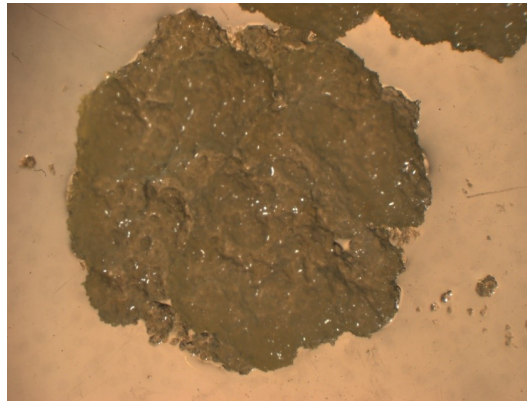


Abbildung 9: Ein Bild der Positivkontrolle auf Nähragar (5 μ M IAA im Medium). Zu sehen ist ein Zellhaufen von 1,5 cm Durchmesser, an dessen Rand noch einzelne Zellen erkennbar sind.

3 Ergebnisse

Im Verlauf des Experiments wurden die Flüssigkulturen unordentlicher, was sich in vermehrt klumpigem Wachstum der zusammenhängenden Zellen, sowie der kugeligeren Wuchsweise der einzelnen Zelle ausdrückte. Vermutlich ist der Grund die Adaptation der Zellen an das Auxin, dessen Wirkung dadurch geschwächt wurde. Das Experiment wurde mit einer zweiten, nicht an Auxin angepassten Zelllinie neu angesetzt.

3.1 Phragmoplastenwinkel

Die Abweichung der Phragmoplastenwinkel von 90° zur Zellachse war bei den Zellen der Kontrollkultur etwas geringer als bei den Zellen der mit NPA behandelten Kultur. Der Unterschied betrug $2,2^\circ$.

Mittelwert der Abweichung (Kontrollkultur): $22,7^\circ$

Mittelwert der Abweichung (NPA-Kultur): $24,9^\circ$

Die Tabellen mit den gemessenen Winkeln und Abweichungen sind im Anhang wiedergegeben.

3.2 Zellkettenlänge

Die Auswertung der ersten und zweiten Zelllinie ist für die Zellketten längen nicht nach der gleichen Methode erfolgt. Bei der ersten Linie wurden einzelne Zellen berücksichtigt, bei der zweiten nicht. Daher werden die Zelllinien getrennt betrachtet.

1. Zelllinie

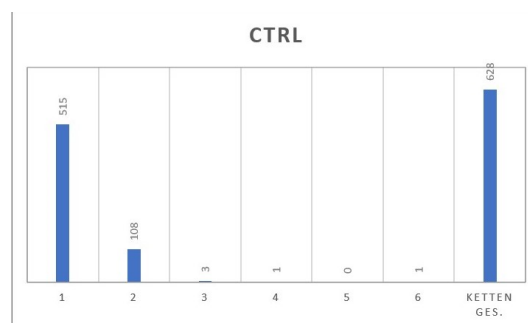


Abbildung 10: Verteilung der Zellkettenlängen in der Kontrolle der ersten Zelllinie

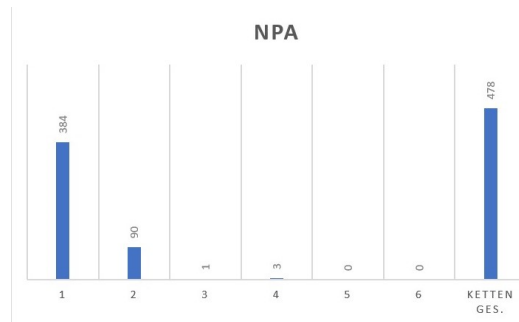


Abbildung 11: Verteilung der Zellkettenlängen in der NPA-Linie (NPA-Konzentration: 3µM) der ersten Zelllinie

	1	2	3	4	5	6	ges
Ctrl	515	108	3	1	0	1	628
NPA	384	90	1	3	0	0	478

Tabelle 1: Verteilung der Zellkettenlängen der ersten Zelllinie

2. Zelllinie

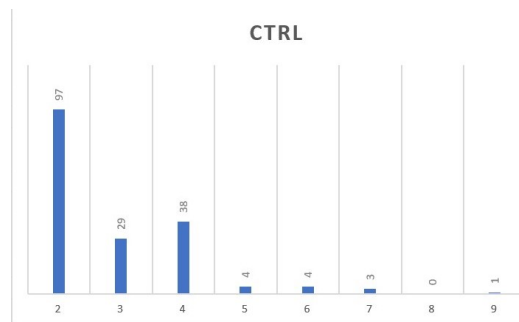


Abbildung 12: Verteilung der Zellkettenlängen in der Kontrolle der zweiten Zelllinie

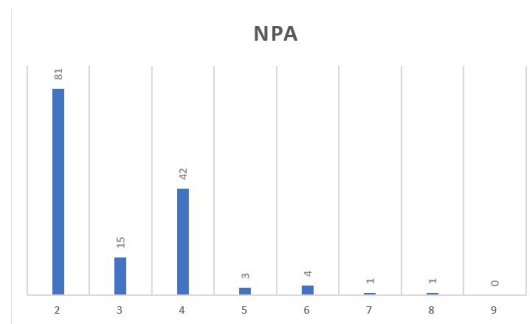


Abbildung 13: Verteilung der Zellkettenlängen in der NPA-Linie (NPA-Konzentration: $3\mu\text{M}$) der zweiten Zelllinie

	2	3	4	5	6	7	8	9	ges
Ctrl	97	29	38	4	4	3	0	1	176
NPA	81	15	42	3	4	1	1	0	147

Tabelle 2: Verteilung der Zellkettenlängen der zweiten Zelllinie

Festkulturen

Es wurden keine auswertbaren Daten erhoben.

4 Diskussion

4.1 Deutung

Phragmoplasten

Die Ausrichtung der Phragmoplasten zur Zellachse in den Zellen der NPA-Linie ist im Durchschnitt größer als die der Kontrolllinie. Dies deutet darauf hin, dass funktionierende Pin-Transportproteine wichtig für intrazelluläre Richtungsfindung sind. Wenn diese Kanäle durch NPA blockiert sind, wird der IAA-Fluss gestört. Das führt zu von der Zellachse stärker abweichenden Teilungen. Dass die Teilung orthogonal zur Zellachse stattfindet, ist wichtig, um Zellketten zu erhalten.

Zellketten

Verhältnis einzelne Zellen zu Ketten (1. Zelllinie):

$$\text{Ctrl: } \frac{515}{113} = 4,558$$

$$\text{NPA: } \frac{384}{94} = 4,051$$

Verhältnis Zweierketten zu längeren Ketten (2. Zelllinie):

$$\text{Ctrl: } \frac{97}{79} = 1,228$$

$$\text{NPA: } \frac{81}{70} = 1,157$$

Die zwei Zelllinien wurden separat ausgewertet, daher sagen die Auswertungen nicht das Gleiche aus. Aber sowohl das Verhältnis von einzelnen Zellen zu zusammenhängenden Ketten (das bei der ersten Linie ermittelt wurde) als auch das Verhältnis von zweizelligen zu längeren Ketten (das bei der zweiten Linie ermittelt wurde) ist bei der Kontrollgruppe größer als bei der NPA-behandelten Kultur. Beides spricht dafür, dass am Ende des Zyklus in der Zellkultur mit NPA der Zerfall der Zellketten etwas weniger weit fortgeschritten ist. Das deutet darauf hin, dass die Inaktivierung der Pin-Transportproteine den Prozess, der zur Trennung der Zellketten führt, stört. Da diese ja Auxin transportieren, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass IAA eine Rolle in der Kommunikation zwischen Zellen in einer Zellkette spielt.

4.2 Fehlerdiskussion

Die Aussagekräftigkeit dieser Deutung ist begrenzt, da unterschiedliche Fehler entstanden sein können. Die erste Möglichkeit ist Unsauberkeit beim An- und Umsetzen der Zellkulturen. Hier sind Verunreinigungen immer ein Risiko, und fehlerhaftes Einwiegen der Zellen kann die Vergleichbarkeit von Kontrollkultur und Versuchskultur beeinträchtigen.

Auch beim Mikroskopieren der Zellen können Fehler entstehen. Vor allem problematisch ist hier, dass bevorzugt Bilder geschossen wurden, die gut erkenn- oder auszählbare Zellen enthalten. Was in unübersichtlicheren Bereichen der Zellkultur, zum Beispiel Zellklumpen, vor sich geht, wird so schlechter in den Ergebnissen repräsentiert.

Das Problem setzt sich in der Auswertung fort, denn Zellen, die nicht gut auswertbar sind, werden nicht gut oder gar nicht ausgewertet. Beim Zählen der Kettenlängen waren auf den Fotos viele Zellketten zu sehen, die verklumpt waren. Die Länge dieser Zellketten konnte nicht bestimmt werden, sie geht also nicht in die Ergebnisse ein.

Ein anderes Problem ist, dass Zellen nicht genau so wachsen, wie man sie sich als Modell vorstellt. Auswertungsmethoden, die dies annehmen, spiegeln nicht die ganze Wahrheit wider. Bei den Phragmoplastenwinkeln schlug sich dies darin nieder, dass nicht immer eine klare Zellachse zu erkennen war, gegen die der Winkel zu messen war. Bei den Zellketten stellt dies insofern ein Problem dar, als nicht alle Zellen in Ketten wuchsen, sondern auch Klumpen bildeten oder sich direkt nach der Teilung trennten.

Außerdem ist die erhobene Datenmenge zu klein, um mit hoher Sicherheit eine Aussage zu machen. Beim Betrachten der abschließenden Aussagen muss also im Hinterkopf behalten werden, dass ihre Aussagekräftigkeit begrenzt ist.

Zuletzt muss noch gesagt werden, dass für die vorliegende Arbeit Zellkulturen benutzt wurden, um etwas über das Verhalten von Zellen im Organismus herauszufinden. Die Ergebnisse sagen etwas über erstere aus, alle Aussagen, die über den Organismus getroffen werden, sind eine Interpretation der Ergebnisse, die auch falsch sein kann.

4.3 Fazit

Die gesammelten Daten weisen darauf hin, dass NPA in einer Konzentration von 3 μM im Nährmedium dazu führt, dass die Zellen ihre Richtung schlechter finden, und außerdem die Kommunikation zwischen Zellen stört. Daraus lässt sich ableiten, dass die durch NPA blockierten Pin-Transportproteine und IAA selbst in diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Die Koordination einer gemeinsamen Wachstumsrichtung der Zellen in Pflanzen gelingt mithilfe des IAA-Stroms entlang der gemeinsamen Zellachse. Auch andere Regulationsprozesse sind von IAA beeinflusst, wie z.B. der Zerfall der Zellketten. Es lässt sich jedoch aus unseren Experimenten nicht sagen, wie dieses spezifische Phänomen auf den ganzen Pflanzenorganismus zu übertragen ist, da sich in diesem die Zellen nicht vollkommen voneinander trennen.

4.4 Ausblick

Während unsere Experimente untersucht haben, inwiefern IAA für die Zusammenarbeit von Zellen in Pflanzen wichtig ist und auch, wie es Einfluss auf sie nimmt, bleiben noch zahlreiche Fragen und mögliche Versuche offen.

Unser Experiment mit den Zellkulturen auf Agar-Platten hat uns keine auswertbaren Ergebnisse gebracht. Wenn man jedoch die Bilder der Kulturen früher machen würde und eine Möglichkeit, besser auswertbare Bilder von den Zellen zu produzieren, fände, dann könnte man durch Festkulturen etwas über den Einfluss von IAA auf nicht freischwimmende Zellen erfahren. Auch würde der IAA-Gradient Einblick in den Einfluss der Konzentration von IAA gewähren.

Weiter mit den markierten Pin-Transportproteinen zu arbeiten, wäre auch wertvoll. Ihr Vorkommen an nur einem Ende der Zelle ist essentiell für die Erhaltung des IAA-Stroms. Wie kommt dieses zustande, vor allem am richtigen Ende?

Und schließlich haben wir mit IAA auch nur ein einziges Phytohormon untersucht. Es gibt zahlreiche andere, und auch die Untersuchung von Wachstumshormonen in nicht pflanzlichen Organismen ist wichtig, um generell die Entstehung von Geweben und Organen aus einzelnen Zellen zu verstehen. Und dann können wir dieses Verständnis eines Tages vielleicht auch nutzen, um in diesen Prozess einzugreifen, um etwa im Labor Gewebe zur Transplantation herzustellen, statt sie einem anderen Organismus entnehmen zu müssen. Oder auch, um zu verstehen, wann er schiefläuft, etwa bei Krebs oder Fehlbildungen von Gliedmaßen.

5 Danksagung

Zuallererst möchten wir Prof. Dr. Peter Nick des Botanischen Instituts, des Karlsruher Institut für Technologie danken, der dieses Projekt angeboten hat, uns in die theoretischen Grundlagen einführte und uns bei Fragen zur Seite stand.

Wir danken auch Christian Metzger, Sabine Purper und Farina Witt, die uns in die praktische Arbeit im Labor einführten und uns tatkräftig unterstützten.

Außerdem geht unser Dank an unsere betreuenden Kursleiter Dietmar Gruber, Norbert Krieg und Anke Richert für die Unterstützung bei diesem Projekt sowie alle anderen Kursleiter des Hector-Seminars, die uns über die letzten Jahre mit Leidenschaft und Geduld begleiteten.

Zuletzt bedanken wir uns bei Josephine und Dr. Hans-Werner Hector, die uns mit ihrer Stiftung eine einzigartige Möglichkeit boten, schon früh einen Einblick in die Welt der Naturwissenschaft zu bekommen.

6 Quellen

- 1 Schmitt, V. et al.: Biochemische und physiologische Versuche mit Pflanzen, Berlin Heidelberg, 2012, S.334
 - 2 Thimann und Went, ca 1930, Artikel noch nicht gefunden
 - 3 www.spektrum.de/lexikon/biologie/auxine/6501 zuletzt besucht am 30.08.2022
 - 4 www.zeiss.de/mikroskopie/produkte/mikroskopsoftware/zen.html zuletzt besucht am 30.08.2022
 - 5 imagej.nih.gov/ij/ zuletzt besucht am 30.08.2022
- Ausschreibung des Projekts 230: Zelluläre Biotechnologie, bscw.hector-seminar.de/bscw/bscw.cgi/5091353 zuletzt besucht am 31.08.22

Außer aus diesen Quellen wurde uns viel Wissen zum Thema auch mündlich von Prof. Dr. Peter Nick und Christian Metzger vermittelt.

Anhang

Gemessene Phragmoplastenwinkel

Die Daten wurden in der ersten und zweiten Zelle separat gemessen. Da die Daten aber einfache Winkelmessungen und damit kompatibel sind, wurden sie zusammen und nicht getrennt betrachtet.

Kontrollkultur:

Winkel [°]	Abweichung von 90°
103,79	13,79
97,9	7,9
21,62	68,38
38,14	51,86
65,34	24,66
75,92	14,08
81,37	8,63
57,325	32,675
68	22
12,68	77,32
66,85	23,15
34	56
90	0
89	1
70	20
96	6
124	34
103	13
83	7
93	3
67	23
85	5
75	15
119	29
56	34
55	35
86	4
130	40
92	2
96	6
104	14
144	54
85	5

NPA-behandelte Kultur:

Winkel [°]	Abweichung von 90°
56,44	33,56
107,94	17,94
86,36	3,64
54,2	35,8
101,7	11,7
116,27	26,77
6,71	83,28
48,81	41,19
88,8	1,2
92,1	2,1
110,4	20,4
56,4	33,6
40	50
106	16
159	69
73	17
83	7
119	29
56	34
74	16
73	17
109	19
21	69
81	9
87	3
82	8
61	29
14	76
101	11
86	4
80	10
33	57
83	7
88	2
88	2

Abbildungsverzeichnis

Sämtliche Abbildungen sind eigene Fotos oder Graphiken.

Titelbild: Orthogonale Projektion einer Zellkette der Versuchsreihe mit NPA der zweiten Linie, vier Tage nach dem Umsetzen aufgenommen. Zu sehen ist ein Phragmoplast.

Abbildung 1: Das Spinning-Disc-Mikroskop in Betrieb; Aufnahme von grün fluoreszierenden Mikrotubuli durch Anregung von UV-Licht. Der Raum ist abgedunkelt, damit das Licht der fluoreszierenden Mikrotubuli besser aufgenommen werden kann.

Abbildung 2: Das Apotom-Mikroskop in Betrieb. Im Moment wird ein Übersichtsbild mit der Tiles-Funktion der Bedienungssoftware erstellt.

Abbildung 3: Die Sterilbank beim Entnehmen von Proben zum Mikroskopieren.

Sterilbank beim Ansetzen der Festkultur aus einer Flüssigkultur. Die Zellen im flüssigen Medium werden auf das feste Medium getropft.

Abbildung 5: Orthogonale Projektion einer Zelle der Kontrollreihe während der Anaphase der Mitose. Das Bild wurde vier Tage nach dem Umsetzen geschossen. 63x Vergrößerung.

Abbildung 6: Übersichtsbild, das mit der Tiles-Funktion der NPA-Versuchsreihe 14 Tage nach dem Umsetzen. Man sieht, dass die Zellen oft einzeln, aber auch in Ketten von zwei oder mehr Zellen vorliegen. 20x Vergrößerung.

Abbildung 7: Die Orthogonale Projektion eines Phragmoplasten, vier Tage nach dem Umsetzen aufgenommen. Die Achse des Phragmoplasten ist rot, die der Zelle blau markiert. Gemessen wird die Abweichung von 90°. 63x Vergrößerung.

Abbildung 8: Schemazeichnung zur Veranschaulichung der Herstellung eines Auxingradienten, Positiv- und Negativkontrolle.

Abbildung 9: Ein Bild der Positivkontrolle auf Nähragar (5 μ M IAA im Medium). Zu sehen ist ein Zellhaufen von 1,5 cm Durchmesser, an dessen Rand noch einzelne Zellen erkennbar sind.

Abbildung 10: Verteilung der Zellkettenlängen in der Kontrolle der ersten Zelllinie.

Abbildung 11: Verteilung der Zellkettenlängen in der NPA-Linie der ersten Zelllinie.

Abbildung 12: Verteilung der Zellkettenlängen in der Kontrolle der zweiten Zelllinie.

Abbildung 13: Verteilung der Zellkettenlängen in der NPA-Linie der zweiten Zelllinie.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der Zellkettenlängen der ersten Zelllinie

Tabelle 2: Verteilung der Zellkettenlängen der zweiten Zelllinie

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichern wir, dass diese Arbeit unter Beratung durch Prof. Dr. Peter Nick, Dietmar Gruber, Anke Richert und Norbert Krieg selbständig verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Annika Rau
Moritz Winter